

PRÄPARATIVE DARSTELLUNG DER
PROTEINASE AKROSIN
AUS EBER- UND HAMSTERSPERMIEN

HANS DIETER NOTHDURFT

1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
der Universität München
Kommissarischer Leiter: Professor Dr. H. Fritz

PRÄPARATIVE DARSTELLUNG DER PROTEINASE AKROSIN AUS EBER- UND HAMSTERSPERMIEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
HANS DIETER NOTHDURFT
aus Heidelberg

München 1976

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München.



Berichterstatter: Prof. Dr. Hans Fritz

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6.7.1976

Herrn Prof. Dr. Hans FRITZ danke ich für die Überlassung
des Themas und für wertvolle Ratschläge und Hinweise.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Instituts,
besonders Herrn Dr. W.-D. SCHLEUNING und Herrn Dipl.-Chem.
H. SCHIESSLER, für die große Unterstützung bei der Durch-
führung dieser Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. AUFGABENSTELLUNG	1
2. EINFÜHRENDE ÜBERSICHT	3
2.1. Anatomie der männlichen Geschlechtsorgane	3
2.2. Die Kapazitation der Spermien	4
2.3. Biochemische Aspekte des Befruchtungsvorgangs	5
2.4. Die Entdeckung des Akrosins	6
2.5. Die Akrosininhibitoren	7
2.6. Entwicklungsschritte in der präparativen Darstellung von Akrosin	9
3. ISOLIERUNG VON AKROSIN AUS EBERSPERMIEN	13
3.1. Ausgangsmaterial	13
3.2. Herstellung der Spermienextrakte	13
3.3. Gelchromatographische Abtrennung des Akrosininhibitors	16
3.4. Affinitätschromatographische Reinigung von Akrosin	21
3.4.1. Zum Prinzip der Affinitätschromatographie	21
3.4.2. Bisherige affinitätschromatographische Reinigungs- verfahren für Eberakrosin	24
3.4.3. Affinitätschromatographische Reinigung von Eber- akrosin mit ABA-Sephrose	25

	Seite
3.5. Stabilisierung des Akrosins nach der Affinitätschromatographie	30
3.6. Affinitätschromatographie von Eberakrosin an Con A-Sepharose	32
4. ISOLIERUNG VON AKROSIN UND AKROSININHIBITOR AUS HAMSTERSPERMIEN	35
4.1. Ausgangsmaterial für die Isolationsversuche	35
4.2. Untersuchung der Suspensionsflüssigkeit auf Akrosingehalt	36
4.3. Extraktion des Akrosins aus Hamsterspermien	38
4.4. Trennung von Akrosin und Akrosininhibitor durch Gelfiltration	39
4.5. Affinitätschromatographie des Hamsterakrosins über ABA-Sepharose	41
5. MATERIAL UND METHODEN	45
5.1. Material	45
5.1.1. Materialien zur Enzymtestung	45
5.1.2. Materialien zur Gelchromatographie	45
5.1.3. Materialien zur Affinitätschromatographie	45
5.1.4. Materialien für die Polyacrylamidgel-Elektrophorese	46

	Seite
5.2. Methoden	46
5.2.1. Akrosin aus Eberspermien	46
5.2.1.1. Herstellung der Spermienextrakte	46
5.2.1.2. Gelchromatographie mit Sephadex G-75	47
5.2.1.3. Bestimmung der spezifischen Aktivität	47
5.2.1.4. Herstellung des Affinitätsharzes	47
5.2.1.5. Affinitätschromatographie mit ABA-Sepharose	48
5.2.1.6. Stabilisierung des harzgereinigten Akrosins	49
5.2.1.7. Affinitätschromatographie mit Con A-Sepharose	50
5.2.2. Akrosin aus Hamsterspermien	50
5.2.2.1. Herstellung der Spermienextrakte	50
5.2.2.2. Gelfiltration mit Sephadex G-75	51
5.2.2.3. Affinitätschromatographie mit ABA-Sepharose	51
5.2.3. Verwendete Enzymtest-Systeme	52
5.2.3.1. BAPA - System	52
5.2.3.2. BLNA - System	52
5.2.3.3. BAEE/ADH - System	52
5.2.4. Polyacrylamidgel - Elektrophorese	53
6. ZUSAMMENFASSUNG	54
7. LITERATURVERZEICHNIS	56
8. LEBENS LAUF	61

IM TEXT VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

ABA-Sephrose	p-Aminobenzamidin-6-aminocapronyl-agarose
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
BAEE	N ^α -Benzoyl-L-Arginin-äthylester
BAPA	N ^α -Benzoyl-DL-Arginin-p-nitroanilid
BLNA	N ^α -Benzoyl-DL-Lysin-p-nitroanilid
CMC	1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoäthyl)- carbodiimid-metho-p-toluen-sulfonat
Con A	Concanavalin A
MES	2-(morpholino)äthan-Sulfonsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
TRA	Triäthanolamin

1.

AUFGABENSTELLUNG

Die Biochemie hat sich in den letzten zwei Jahrzehnten zu einem wichtigen Faktor bei der Aufdeckung und Erklärung von Phänomenen entwickelt, die der Fortpflanzung von Mensch und Tier zugrunde liegen. Dabei trat besonders die Untersuchung der enzymatischen Vorgänge, die sich beim Befruchtungsvorgang abspielen, in den Vordergrund des Interesses.

Die Spermien aller bisher untersuchten Spezies, einschließlich der Spezies Mensch, enthalten in ihren Kopfkappen eine Reihe verschiedener Enzyme, die für die Fortpflanzung von Bedeutung sind. Unter diesen akrosomalen Enzymen befindet sich auch eine basische Proteinase, das AKROSIN.

Die biologisch wesentliche Bedeutung dieses Enzyms für den Befruchtungsvorgang ist heute allgemein anerkannt. Sie wird im folgenden Kapitel eingehend dargestellt.

Ein entscheidendes Problem bei allen Untersuchungen über Eigenschaften und Wirkungsweise dieser Proteinase ist der Mangel an ausreichenden Enzymmengen von hoher Reinheit und Stabilität.

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war es daher, in größerem Maßstab hochgereinigte Akrosinpräparationen herzustellen, die für weitere biochemische Untersuchungen und vor allem für in vivo - Studien an Versuchstieren Verwendung finden sollten.

Als Ausgangsmaterial wurde Ebersperma gewählt, da es auch in größeren Mengen relativ leicht erhältlich ist und über eine hohe Spermiedichte verfügt.

Zur Isolation und Feinreinigung des Akrosins sollte eine kombinierte gel- und affinitätschromatographische Methode ausgearbeitet werden, die einerseits stabile Enzympräparationen von hohem Reinheitsgrad gewährleistet, andererseits hinsichtlich der technischen Durchführung und Effizienz zur Herstellung größerer Substanzmengen geeignet ist.

Dabei konnte in vielen Fragen auf methodische Vorarbeiten von SCHLEUNING, SCHIESSLER und FRITZ zurückgegriffen werden (1).

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Arbeit stellte der Versuch dar, Akrosin aus Hamsterspermien zu isolieren. Dabei sollte sich erweisen, inwieweit mit ein und der gleichen Methode Akrosin verschiedener Spezies - in diesem Falle Eber und Hamster - in gereinigter Form dargestellt werden könne. Die Isolierung von Hamsterakrosin erschien auch deshalb noch interessant, weil Akrosin dieser Spezies in der gesamten Literatur bisher nicht beschrieben wurde.

EINFÜHRENDE ÜBERSICHT

1.

Anatomie der männlichen Geschlechtsorgane

Das anatomische System der Fortpflanzung umfaßt beim Mann folgende Organe:

- In den Samenkanälchen des Hodens werden die Spermien gebildet.
- Im Nebenhoden werden die Spermien vor der Ejakulation gespeichert.
- Der Samenleiter verbindet den Nebenhoden mit der Harnröhre, die als Ausführungsgang über Blasenhals und Penis die Verbindung zur Außenwelt schafft.
- Die akzessorischen Geschlechtsdrüsen, zu denen die Samenbläschen, die Prostata und die Cowper'schen Drüsen gehören, bilden zusammen mit den Sekreten der Epididymis das Seminalplasma des Ejakulats.

Die Spermien bestehen aus einem Kopfteil und einem Schwanz, der zur Fortbewegung dient. Der zentrale Anteil des Spermienkopfes wird nucleus genannt und enthält Chromosomenmaterial, hauptsächlich DNS und basische Proteine. Das Vorderteil des nucleus wird von zwei sackartig geformten Membranen bedeckt, dem Akrosom.

Das Akrosom des Spermatozoons entsteht durch Verschmelzung abgeschnürter Vakuolen aus dem Golgi-Apparat, die eine Reihe hydrolytischer Enzyme enthalten. Diese Enzyme entsprechen weitgehend der enzymatischen Ausstattung von Lysosomen, weshalb heute die Akrosomenkappe des Spermiums allgemein als modifiziertes Lysosom angesehen wird.

Im Zuge der Spermatogenese verlassen die Spermien die Samenkanälchen des Hodens und werden im rete testis gesammelt. Von dort gelangen sie in die Epididymis, in deren Schwanzteil sie gespeichert werden.

2.2.

Die Kapazitation der Spermien

Epididymale und ejakulierte (also mit den Sekreten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen vermischte) Spermien sind nicht oder nur bedingt befruchtungsfähig. Erst während ihrer Wanderung durch den weiblichen Genitaltrakt erhalten sie ihre Befruchtungsfähigkeit. Dieser Reifungsvorgang der Spermien im weiblichen Genitaltrakt wird Kapazitation genannt (2,3,4,5). Die Kapazitation der Spermien benötigt je nach Spezies zwei bis sechs Stunden. Der Kapazitationsvorgang ist hormonabhängig: unter der Wirkung des Hormons Progesteron wird die Kapazitation verzögert oder sogar ganz unterbunden, unter Einfluß des Hormons Östrogen dagegen stark beschleunigt (2,4). Experimentell konnte eine Kapazitation der Spermien auch außerhalb des weiblichen Genitaltrakts erreicht werden, indem ejakulierte Spermien in Follikular- und Tubarflüssigkeit

inkubiert wurden. (6). Umgekehrt verloren bereits kapazitierte Spermien wieder ihre Befruchtungsfähigkeit, wenn sie erneut mit Seminalplasma in Kontakt gebracht wurden - sie wurden dekapazitiert (7,8) .

Allen bisher untersuchten Säugetierspezies ist gemeinsam, daß nur Spermien die den Prozeß der Kapazitation vollzogen haben, zu einer Befruchtung der weiblichen Eizelle in der Lage sind.

3.

Biochemische Aspekte des Befruchtungsvorgangs

Beim Befruchtungsvorgang durchdringt das kapazitierte Spermium die das Ei umhüllenden Zellschichten und Membranen. Die äußerste Grenzschicht des Eies wird von einem breiten Wall von Granulosazellen gebildet, dem cumulus oophorus. Nach innen zu folgt eine wesentlich dünnere Schicht von corona-radiata-Zellen, die wiederum unmittelbar der zona pellucida aufsitzen. Die zona pellucida ist zellos und enthält Mucopolysaccharide und Mucoproteine. Die Dottergrenzmembran (Vitellusmembran) bildet dann die innerste Begrenzung des Eies.

Die Penetration des Spermiums in das Ei wird durch die hydrolytische Aktivität im Akrosom enthaltener Enzyme ermöglicht. Während die Durchdringung der zwei äußersten Eihüllen (cumulus oophorus und corona radiata) den akrosomalen Enzymen Hyaluronidase, Neuraminidase und dem sogenannten "corona penetrating enzyme (CPE)" zugeschrieben wird, erfolgt die Auflösung der innersten Eischicht, der zona pellucida, im wesentlichen durch das proteolytische Enzym Akrosin (9,10) .

Die Untersuchung mehrerer Arbeitsgruppen sprechen dafür, daß das Akrosin an der inneren akrosomalen Membran im Spermium lokalisiert und erst beim Befruchtungsvorgang freigesetzt wird (11,12,13,14) .

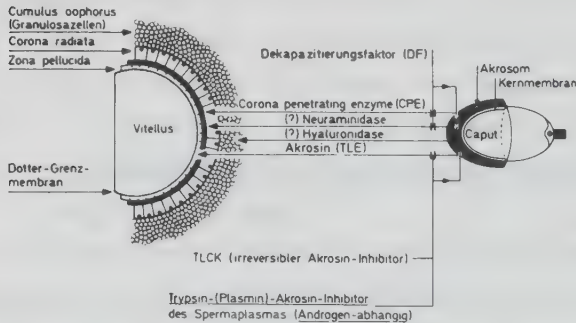


Abb. 1: Schematische Darstellung von Eizelle und Spermium mit den Enzymen des Akrosoms sowie deren Inhibitoren nach FRITZ et al. (50)

2.4. Die Entdeckung des Akrosins

Erste Hinweise für die Existenz eines proteolytischen Enzyms im Spermium, das einen auflösenden Effekt auf die Eihüllen besitzt, wurden schon in den frühen dreißiger Jahren von YAMANE gegeben (15,16). Die nächsten Berichte über Proteinasen aus Spermien verschiedener Spezies folgten erst zwanzig Jahre später, als BURUIANA (17) und später WALDSCHMIDT (18) trypsinähnliche Wirkungen von Spermien

und Spermienextrakten beschrieben. Etwa zur gleichen Zeit (1965) konnten HARTREE und SRIVASTAVA durch selektives Abtrennen der Spermienkopfkappen zeigen, daß die in Spermien gefundene Proteinase akrosomaler Herkunft ist (19,20). Diese Ergebnisse wurden 1968/69 von STAMBAUGH und BUCKLEY bestätigt und noch dahingehend erweitert, daß diese akrosomale Proteinase in der Lage ist, die zona pellucida des Eies aufzulösen (21,22). Erste Erfolge in der Reinigung und Charakterisierung dieses Enzyms gelangen wenig später ZANEVELD et al. (23,24). ZANEVELD konnte dabei nachweisen, daß es sich um eine eigenständige, bisher unbekannte Proteinase handelt und gab ihr den Namen Akrosin. Diese Bezeichnung wurde 1972 offiziell von der "Comission on Biochemical Nomenclature" als Enzym Nr. 3.4.21.10. übernommen.

Die Akrosininhibitoren

Akrosininhibitoren aus Sekreten und Geweben des männlichen Genitaltrakts wurden als Hemmsubstanzen für Trypsin 1965 von HAENDLE et al. (25,26) und - unabhängig davon - von WALDSCHMIDT et al. entdeckt.

Akrosin wird von allen diesen aus dem Genitaltrakt stammenden Trypsininhibitoren sehr stark gehemmt (27).

ZANEVELD und Mitarbeiter haben beobachtet, daß die enzymatische Aktivität von Akrosin im epididymalen und kapazitierten Spermium hoch, im ejakulierten aber niedrig ist (28). Sie ziehen daraus den Schluß, daß ein Inhibitor aus den Sekreten

Spezies	Hoden	Epidi- dymis	Vesikular- drüsen	Seminal- plasma
Mensch	70-100	50- 80	50- 100	150- 330
Rind	40- 70	50- 80	900-1500	2400-3100
Schwein	90-120	70-110	500-1000	800-1200
Schaf	-	-	250- 500	-
Ratte	100-200	90-130	1400-1600	-
Maus	90-130	100-200	2200-2700	-
Meerschweinchen	100-220	300-400	3500-5000	-
Hamster	60- 90	80-120	300- 600	-

Tab. 1 Trypsin-Inhibitor-Aktivität in männlichen Geschlechtsdrüsen und ihren Sekreten nach HAENDLE (26)

Angaben in mIU pro g Gewebe oder ml Sekret.
1 mIU entspricht der Hemmung von ca. 1 μ g Trypsin.

des männlichen Genitaltraktes bei der Ejakulation in die Spermien eindringt und bei der Kapazitation wieder aus diesen verschwindet. Dieser Auffassung lag die Annahme zugrunde, das Akrosin bilde mit dem Inhibitor innerhalb der Akrosomenkappe einen Komplex (28). WENDT et al. konnten jedoch unter Verwendung von Gelatineplatten nachweisen, daß Akrosin aus ejakulierten Spermien trotz gleichzeitiger Anwesenheit des Inhibitors eine Gelatinolyse bewirkt, also in aktiver Form in den Akrosomen vorliegt (29).

Aus diesen Untersuchungen lassen sich zwar Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Kapazitation der Spermien und Wirkung des Inhibitors ableiten. Ob jedoch die Abtrennung des Inhibitors von der Akrosomenmembran einen wesentlichen Vorgang der Kapazitation darstellt, muß noch als ungeklärt gelten.

Entwicklungsschritte in der präparativen Darstellung von Akrosin

POLAKOWSKI, ZANEVELD und WILLIAMS konnten als erste Arbeitsgruppe Akrosin, damals noch "trypsin like enzyme" genannt, aus Kaninchenspermien isolieren, allerdings nur in sehr instabiler Form. Zur Extraktion des in den Akrosomen lokalisierten Enzyms inkubierten sie die Spermien nach der von HARTREE (31) angegebenen Methode in neutraler Detergentienlösung bei 37 ° Celsius (30).

In den auf diese Weise hergestellten Extrakten fanden POLAKOWSKI et al. hohe Akrosinaktivitäten, wenn von epididymalen oder kapazitierten Spermien ausgegangen wurde (32) . Neutrale Extrakte aus ejakulierten Spermien zeigten jedoch kaum oder gar keine Akrosinaktivität. Durch Ansäuern dieser Extrakte auf einen pH-Wert zwischen 2 und 3 ließ sich auch hier Aktivität freisetzen, die aber bei erneuter Umstellung auf einen neutralen pH-Wert wieder verschwand. Dieser Vorgang konnte mehrfach wiederholt werden, war also voll reversibel.

Nach Ionenaustauschchromatographie der neutralen Extrakte aus ejakulierten Spermien ließ sich auch im neutralen pH-Bereich Akrosinaktivität nachweisen (33).

Diese Untersuchungen beweisen, daß Akrosin in den neutralen Spermienextrakten als Enzym-Inhibitor-Komplex vorliegt, bei Ansäuern dieser Komplex jedoch wieder in seine beiden Komponenten dissoziiert. Durch chromatographische Trennverfahren kann der Akrosininhibitor nun abgetrennt werden. Nach jüngeren Arbeiten (29) scheint es jedoch zweifelhaft, daß physiologischer Weise Akrosin im Spermium als Akrosin-Inhibitor-Komplex

vorliegt. Die Spermien unterliegen einem natürlichen Alterungsprozeß, bei dem sie teilweise ihre Kopfkappen verlieren. Es findet sich daher auch Akrosin im Spermaplasma. Allerdings bildet der im Spermaplasma vorkommende Akrosininhibitor mit diesem freigesetzten Akrosin einen Komplex und schützt dadurch Schleimhäute sowie andere Spermien vor einer möglichen Schädigung durch proteolytische Enzymwirkungen.

ZANEVELD und Mitarbeiter konnten mit ihrer Isolierungsmethode nur eine sehr instabile, schnell an Aktivität verlierende Akrosinpräparationen herstellen. Darüberhinaus besteht bei ihrem Vorgehen zur Herstellung akrosomaler Extrakte die Möglichkeit, daß es durch die 90-minütige Inkubation bei 37 ° C (30) zu einem teilweisen Abbau von Akrosin kommen kann, sei es durch Selbstverdauung oder durch die Wirkung anderer im Sperma vorkommender Proteinasen.

Zur Herstellung akrosomaler Extrakte wurden noch andere Verfahren beschrieben. Doch weder die Entfernung der Spermienkopfkappen durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen (34) noch durch Schütteln der suspendierten Spermien mit Glaspuder (35) brachten erfolgversprechende Ausbeuten.

Erst FINK, SCHIESSLER, ARNHOLD und FRITZ fanden eine Methode, das in den Akrosomen lokalisierte Akrosin auf technisch einfache und zugleich schonende Weise zu extrahieren (36) .

Sie behandelten die in physiologischer Kochsalzlösung gewaschenen Spermien mehrfach mit 2 %-iger Essigsäure und erhielten somit saure Extrakte, die eine hohe Akrosinaktivität aufwiesen. Die Gefahr der proteolytischen (Selbst-) Andauung von Akrosin kann mit dieser Methode durch Arbeiten im sauren Milieu weitgehend gebannt werden.

ZANEVELD und POLAKOWSKI versuchten eine Feinreinigung des in den akrosomalen Extrakten aus Eberspermien vorliegenden Akrosins über alkoholische Fällung, Chromatographie an DAEE-Zellulose und anschließender Gelfiltration über Sephadex G - 100 (30). Die nach dieser Methode isolierte Akrosin-Präparation erwies sich jedoch als sehr instabil, auch war die Ausbeute nicht sehr befriedigend.

SCHLEUNING et al. entwickelten schließlich eine Isolationsmethode, die neben hohen Ausbeuten einen auf anderen Wegen bisher unerreichten Reinheitsgrad der Akrosinpräparationen ermöglicht (1).

Dieses Verfahren beinhaltet mehrere aufeinanderfolgende Isolations-schritte: die essigsauren Extrakte von Eberspermien werden über eine Chromatographiesäule mit Sephadex G-75 vorgereinigt. Mit diesem Schritt wird der in den Spermienextrakten vorhandene Akrosininhibitor abgetrennt. Daran schließt sich eine affinitätschromatographische Feinreinigung mit Hilfe von Benzamidin-Aminoalkylcellulose an. In einem dritten Schritt schließlich wird das hochgereinigte Akrosin mit Saccharose versetzt und lyophilisiert. Das in lyophilisierter Form vorliegende Akrosin-Saccharose-Gemisch

ist äußerst stabil und zeigt selbst nach Monaten bei Lagerung im Kühlschrank (4 °C) keine nennenswerten Aktivitätsverluste (1).

Mit diesem Verfahren konnten SCHLEUNING et al. inzwischen über 100 mg hochgereinigtes Akrosin aus Eberspermien isolieren und wesentliche Untersuchungen zur Charakterisierung dieses Enzyms vornehmen (38).

Die Methode erwies sich auch zur Isolierung von Akrosin aus menschlichen Spermien als geeignet (SCHLEUNING und FRITZ, persönliche Mitteilungen).

ISOLIERUNG VON AKROSIN AUS EBERSPERMIEN

1. Ausgangsmaterial

Das Ausgangsmaterial für unsere Untersuchungen stellte Sperma von drei verschiedenen Ebern (Deutsche Landschweinrasse) dar, das von Tierärzten in üblicher Weise unter Zuhilfenahme einer künstlichen Scheide am Phantom gewonnen wurde ⁺⁾ . Die dem Sperma bei der Ejakulation beigemengten Schleimstoffe wurden sofort durch Filtration über grobmaschige Gaze abgetrennt.

Das frischgewonnene Sperma (120 - 170 ml pro Ejakulat) wurde entweder noch am gleichen Tage weiterverarbeitet oder aber für 1 - 3 Tage bei 4 ° C gelagert. Einige Spermaproben wurden für spätere Untersuchungen im Nativzustand bei - 40° C eingefroren.

2. Herstellung der Spermienextrakte

Wie im Abschnitt "Material und Methoden" eingehend beschrieben, wurde das Ebersperma weiter aufbereitet. Das durch Zentrifugieren gewonnene Spermis sediment wurde mehrfach mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, um unspezifisch an die Spermienmembranen gebundene Stoffe weitgehend zu entfernen.

⁺⁾ An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. Werner Leidl und seinen Mitarbeitern vom Institut für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, insbesondere Andrologie und Künstliche Besamung, der Universität München für die freundliche Unterstützung bei der Spermabeschaffung danken.

Anschließend wurden die Spermien in 0,067 M Phosphatpuffer pH 7,8 suspendiert, mit 10 % Glycerin versetzt und mehrfach hintereinander schockgefroren und wieder aufgetaut. Erst dann begann der eigentliche Extraktionsvorgang.

Diese Vorbehandlung der Spermien basiert auf der Beobachtung von SCHILL an Humansperma, daß einige Zeit extravital gelagerte Spermien gegenüber frisch ejakulierten höhere extrahierbare Akrosinaktivität zeigen. SCHILL stellte zusätzlich fest, daß ein Zusatz von Glycerin zu den Spermaproben die Extrahierbarkeit von Akrosin deutlich verbessern kann (37).

Wahrscheinlich beruht dieser Effekt auf einer unspezifischen Schädigung der akrosomalen Membranstrukturen, so daß die anschließende Extraktion auf bereits vorgeschädigte Spermienköpfkappen trifft. Der Erhöhung der extrahierbaren Akrosinaktivitäten bei längerer Lagerung der Spermien liegt wohl ebenfalls eine "Alters-" Schädigung der Akrosomenmembran zugrunde.

SCHLEUNING konnte den Einfluß membranschädigender Prozeduren auf die extrahierbare Akrosinaktivität bei Eberspermien exakt nachweisen (38).

Die eigentliche Extraktion erfolgte mit 2%-iger Essigsäure nach der im Kapitel "Material und Methoden" beschriebenen Art und Weise.

Die Höhe der in den sauren Spermienextrakten nachweisbaren Akrosinaktivität war nicht immer gleich, selbst wenn von

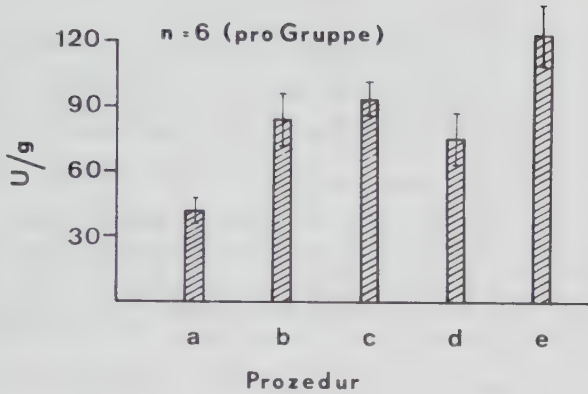


Abb. 2: Der Einfluß von membranschädigenden Prozeduren auf die extrahierbare Akrosinaktivität nach SCHLEUNING
Abszisse: U/g Spermiensediment (Substrat BAEE)

- Ordinate:
- a) Extraktion mit 2 %-iger Essigsäure
 - b) Vorbehandlung durch Einfrieren und Auftauen
 - c) Vorinkubation in 0,067 M Phosphatpuffer pH 7,8, 0,1 % SDS
 - d) Vorinkubation in 0,067 M Phosphatpuffer pH 7,8, 10 % Glycerin
 - e) Vorbehandlung durch Einfrieren und Auftauen und anschließender Inkubation in 0,067 M Phosphatpuffer pH 7,8, 10 % Glycerin

gleichen Sperma volumina ein und desselben Ebers ausgegangen wurde. Die Ausbeute an Akrosinaktivität schwankte bei 14 Extraktionen unter Anwendung der gleichen Methode zwischen 6 und 15 U (Substrat BAPA) pro ml Spermiensediment bei einem durchschnittlichen Spermiensediment von 15 ml pro Versuch.

Als Ursache für diese weite Streuung der erzielten Akrosinaktivitäten ist der unterschiedliche Lagerungszustand bzw. der aktuell vor der Extraktion bestehende Zustand der akrosomalen Membranen anzusehen. Weder die Bestimmung des Spermengewichts noch die mikroskopische Spermienzählung ergeben daher zuverlässige Angaben über die extrahierbare Akrosinaktivität der jeweiligen Spermaprobe. Eine Korrelation zwischen Spermiedichte und Akrosinausbeute, wie sie von FINK et al. angegeben wurde, kann aus diesem Grund nur als grober Orientierungsrahmen angesehen werden (36).

3. Gelchromatographische Abtrennung des Akrosininhibitors

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß Akrosin in neutralen Spermienextrakten als Enzym-Inhibitor-Komplex vorliegt, bei einer Verschiebung des pH ins Saure dieser Komplex jedoch wieder in seine Einzelkomponenten dissoziiert.

Diese Reaktion folgt - vereinfacht dargestellt - dem Massenwirkungsgesetz: Enzym und Inhibitor stehen mit dem Enzym-Inhibitor-Komplex in einem Gleichgewicht, das von der Dissoziationskonstante (K_i) des Komplexes bestimmt ist.

Im neutralen Milieu sind die Dissoziationskonstanten der Komplexe im allgemeinen sehr klein ($< 10^{-8}$ M). Je weiter sich das pH-Milieu zum sauren Bereich hinbewegt, desto mehr verschiebt sich das Dissoziationsgleichgewicht zugunsten der Einzelkomponenten, bis schließlich eine nahezu vollständige Dissoziation des Komplexes erreicht ist.

Die Abtrennung des Inhibitors vom Akrosin mittels Gelchromatographie erfolgte daher in stark saurem Milieu bei pH 2,0. Eine Auftrennung im basischen Bereich kam nicht in Frage, da Akrosin schon bei pH 9 in kurzer Zeit denaturiert wird.

Die Gelchromatographie ist genauer betrachtet nichts anderes als ein Molekularsieb, mit dem verschiedene Komponenten eines Substanzgemischs entsprechend ihrer Molekülgröße resp. ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden können. Die Wahl des geeigneten Gels wird deshalb durch die Unterschiede in den Molekulargewichten der aufzutrennenden Einzelkomponenten bestimmt.

Eberakrosin hat ein Molekulargewicht von ca. 38 000, sein Inhibitor von ca. 12 000 (39). Akrosin und Akrosininhibitor sind also in ihren Molekulargewichten deutlich unterschieden. Es kann daher ein großporiges Gel mit relativ geringem Trennvermögen benutzt werden, um noch eine sichere Trennung der beiden Komponenten zu erreichen, ohne niedrige Durchflußraten in Kauf nehmen zu müssen.

Zur Akrosininisolierung im präparativen Maßstab hat sich das handelsübliche Gel Sephadex G-75 schon früher als sehr geeignet erwiesen. (36). Als Elutionsmittel diente aus praktischen Überlegungen 2 %-ige Essigsäure: durch Verwendung von Essigsäure sowohl als Extraktions- wie auch als Elutionsmittel

konnten die ultrafiltrierten Spermienextrakte ohne weitere Zwischenschritte auf die Chromatographiesäule aufgetragen werden.

Wie die Abbildung 3 zeigt, konnte durch die Chromatographie über Sephadex G-75 eine vollständige Abtrennung des Inhibitors und damit eine inhibitorfreie Akrosinpräparation erzielt werden.

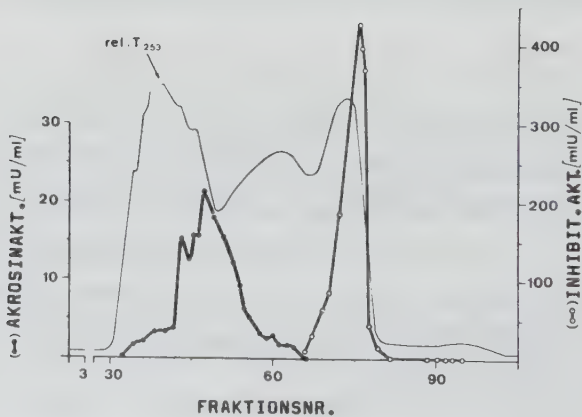


Abb. 3: Trennung von Akrosin und Akrosininhibitor durch Gelfiltration über Sephadex G-75
Linke Ordinate: mU Akrosin/ml (Substrat BLNA)
Rechte Ordinate: mIU Akrosininhibitor/ml (Substrat BAPA)
T₂₅₃: Rel. Transmission bei 253 nm

Die Temperatur hat einen maßgeblichen Einfluß auf die Haltbarkeit der durch Gelfiltration erhaltenen Akrosinlösung. Ein einfaches Experiment soll dies demonstrieren: eine Probe von 10 ml Sephadex G-75-gereinigter Akrosinlösung wurde in zwei gleiche Portionen aufgeteilt. Die eine wurde bei 4°C, die andere bei 23°C über mehrere Tage aufbewahrt. In bestimmten Zeitabständen wurde die Veränderung der Akrosinaktivität, prozentual bezogen auf die Anfangsaktivität, bei beiden Akrosinportionen gemessen. Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, zeigte die bei 4°C gelagerte Akrosinlösung noch nach 48 Stunden keinen nennenswerten Aktivitätsverlust; die bei 23°C gelagerte Portion wies jedoch nur noch knapp 40 % der Ausgangsaktivität auf.

Auf Grund dieser Beobachtung mußte angenommen werden, daß bereits während der Gelchromatographie temperaturbedingte Aktivitätsverluste eintreten. Es wurde daher während des gesamten Gelfiltrationsvorgangs - wie auch bei allen später durchgeführten Isolationsschritten - bei niedrigen Temperaturen (ca. 4°C) gearbeitet. Unter Verwendung gekühlter Chromatographiesäulen und Puffer sowie einer Klimabox zur Kühlung des Fraktionensammlers und der Elutionsvolumina konnte allein bei der Gelfiltration eine Verbesserung der Ausbeute an Akrosinaktivität um 30 % erzielt werden.

Die Tabelle 2 zeigt zusätzlich noch das Verhalten einer von pH 2,0 auf pH 7,8 umgestellten Akrosinlösung (nach Gelfiltration) bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen. Auch hier

- 2: Einfluß der Lagerungstemperatur auf Aktivitätsveränderungen gelfiltrierter Akrosinlösungen in % der Ausgangsaktivität.

Probe A: 10 ml essigsaure Akrosinlösung pH 2,0
Aktivität bei Versuchsbeginn: 240 mU/ml (BAPA)

Probe B: 10 ml essigsaure Akrosinlösung pH 2,0,
mit NaOH/TRA auf pH 7,8 umgestellt.
Aktivität bei Versuchsbeginn: 215 mU/ml (BAPA)

Probe A		Probe B		Zeit
4°C	23°C	4°C	23°C	
100 %	100 %	100 %	100 %	Versuchsbeginn
100 %	72 %	85 %	77 %	nach 2 h
97 %	59 %	84 %	69 %	nach 12 h
97 %	56 %	80 %	73 %	nach 21 h
97 %	50 %	84 %	69 %	nach 24 h
94 %	41 %	80 %	62 %	nach 36 h
94 %	38 %	82 %	61 %	nach 48 h
84 %	28 %	80 %	58 %	nach 64 h
69 %	22 %	77 %	58 %	nach 87 h

ist zu sehen, daß die bei 4°C gelagerte Akrosinportion nach einem initialen Aktivitätsverlust über einige Tage stabil bleibt. Die bei 23°C aufbewahrte Portion hingegen läßt eine, wenn auch erstaunlich langsame Aktivitätsminderung erkennen.

Affinitätschromatographische Reinigung von Akrosin

Zum Prinzip der Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie hat in den letzten Jahren als neue Reinigungsmethode bei der Isolierung von Proteinen und anderen biologischen Substanzen große Bedeutung erlangt. Die herkömmlichen Methoden der Proteinreinigung beruhen auf Unterschieden in den physikochemischen Eigenschaften der Proteine wie Löslichkeit, Ladung, Größe und Gestalt der Moleküle; sie sind demnach nicht spezifisch für eine bestimmte Substanz. Demgegenüber beruht die Affinitätschromatographie auf der spezifischen Wechselwirkung von zwei Reaktionspartnern, die mit einander stabile Komplexe bilden können, z.B. auf der Komplexbildung eines Enzyms mit seinem Inhibitor. Durch kovalente Bindung einer der beiden Reaktionspartner, des Effektors (im genannten Beispiel des Inhibitors), an einen wasserunlöslichen Träger gewinnt man das Affinitätsharz. Die Wirkungsweise eines Affinitätsharzes veranschaulicht die Abbildung 4 .

Man packt das Harz in eine Säule und schickt eine wässrige Lösung des affinen Partners (im genannten Beispiel: Akrosin) darüber. Dieser wird unter geeigneten Bedingungen durch Komplexbildung mit dem unlöslichen Effektor festgehalten, während die Begleitsubstanzen (z.B. Fremdproteine) ungehindert die Säule passieren. Die Chromatographiesäule wird von Begleitsubstanzen völlig freigewaschen und der Komplex anschließend

durch Veränderung der Ionenstärke, pH-Änderung oder Zusatz eines konkurrierenden affinen Partners gespalten. So kann die gewünschte Substanz in reiner Form von der Säule eluiert werden.

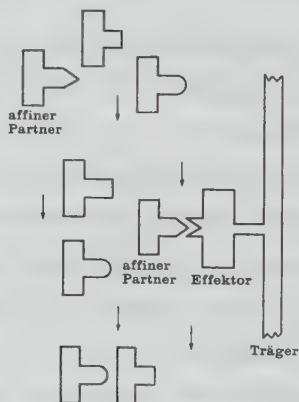


Abb. 4: Wirkungsweise eines Affinitätsharz

Die größte Schwierigkeit in der erfolgreichen Anwendung der Methode besteht darin, ein für den konkreten Fall geeignetes Affinitätsharz zu finden.

Ein idealer Träger für die Affinitätschromatographie sollte folgende Eigenschaften haben: er muß makroporös und völlig wasserunlöslich, aber hydrophil, d.h. gut benetzbar und quellbar sein. Er muß chemisch und mechanisch resistent sein und sterische Behinderungen beim Bindungsvorgang ausschließen. Ein idealer Träger darf keine unspezifischen Wechselwirkungen

mit den zu trennenden Substanzen eingehen. Seine Bindung mit dem Effektor muß über lange Zeit unter den Bedingungen der Adsorption und Elution zu isolierender Substanzen stabil bleiben. Schließlich muß ein solcher Träger technisch einfach zu handhaben sein und ausreichende Laufgeschwindigkeiten der gepackten Säule gewährleisten.

Es ist bislang kein Trägermaterial bekannt, das alle genannten Anforderungen voll erfüllt. Auf unterschiedliche Weise kommen jedoch bestimmte Agarose- und Zelloxiderivate, Polyacrylamid-gele und poröses Glas diesen Bedingungen nahe und haben daher als Trägermaterialien in der Affinitätschromatographie Verwendung gefunden.

Obwohl die Affinitätschromatographie im Prinzip schon seit über 60 Jahren bekannt ist, fand sie erst seit Einführung universell geeigneter Trägermaterialien im Jahre 1968 durch CUATRECASAS, WILCHEK und ANFINSEN breitere Anwendung bei der Isolierung von Proteinen (40). In dieser Zeit erfuhr die Methode noch eine entscheidende Verbesserung: die Effektoren wurden nicht mehr direkt an eine Trägermatrix, sondern über Seitenketten, sog. spacer, gebunden (41). Dadurch können - vor allem bei der Isolierung von Makromolekülen - sterische Behinderungen zwischen gebundenem Effektor und gelöstem affinem Partner weitgehend ausgeschlossen werden, wodurch die Bindungskapazität des Harzes zunimmt.

4.2. Bisherige affinitätschromatographische Reinigungsverfahren
für Eberakrosin

Bereits 1972 wurde von FINK et al. (36) eine affinitätschromatographische Methode zur Reinigung von Eberakrosin beschrieben. Als Träger diente ein Zellulosederivat, als an den Träger gebundener Effektor ein Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen. Die Effizienz dieses Verfahrens war jedoch sehr gering, da die erzielten spezifischen Aktivitäten der Präparationen nicht über 5 U/mg (Substrat BAPA) hinausgingen und auch die Ausbeute bei diesem Isolationsschritt im Durchschnitt nur 50 % betrug.

Ein für präparative Zwecke besser geeignetes affinitätschromatographisches Reinigungsverfahren konnten erst SCHLEUNING et al. angeben (1). Sie verwandten als Affinitätsharz Succinylaminohexyl-Zellulose, an die p-Aminobenzamidin als spezifisches Effektormolekül gebunden wird.

Benzamidin ist schon seit einiger Zeit als guter Hemmstoff für Akrosin bekannt (27). Es lag daher nahe, an einen unlöslichen Träger gebundenes Benzamidin als spezifisches Adsorbens für Akrosin herzunehmen. Als zusätzlicher Vorteil erwies sich dabei die hohe chemische und thermische Resistenz des Benzamidins.

Mit diesem Benzamidin-Zellulose-Harz konnten SCHLEUNING et al. erstmals Präparationen von hochgereinigtem Eberakrosin herstellen (38).

Die Handhabung dieses Trägers auf Zellulosebasis, der von der Firma Merck zur Verfügung gestellt wurde, erwies sich jedoch als schwierig und zeitraubend. Immer wieder traten bei der Hernahme einer frischen Harzpackung sogenannte "faints", das sind feinste abgelöste Schwebeteilchen, in der Elutionsflüssigkeit auf, die trotz umständlicher Waschprozeduren nicht beseitigt werden konnten. Es mußten hintereinander mehrere Chargen dieses Affinitätsharzes ausprobiert werden, um darunter schließlich eine von Schwebeteilchen restlos freie Harzpackung zu finden, mit der die Affinitätschromatographie begonnen werden konnte.

Zusätzlich zeigte das in die Säule gepackte Zelluloseharz bei unseren Versuchen sehr schlechte Fließeigenschaften und von Charge zu Charge erhebliche Schwankungen in der Beladungskapazität.

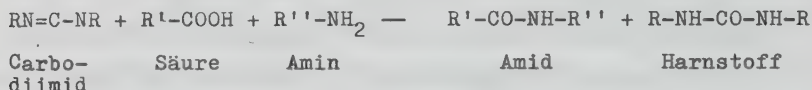
Aus diesem Grunde suchten wir nach einem Trägermaterial, das einfacher zu handhaben und hinsichtlich Reproduzierbarkeit und Beladungskapazität zuverlässiger sein sollte.

4.3. Affinitätschromatographische Reinigung von Eberakrosin mit p-Aminobenzamidin-6-aminocapronyl-agarose (ABA-sepharose)

Zur spezifischen Reinigung von Akrosin stellten wir ein Affinitätsharz auf Agarose-Basis her.

Als Ausgangsmaterial diente CH-Sepharose 4 B der Firma Pharmacia.

CH-Sepharose 4 B besteht aus einer Agarosematrix mit sechskettigen Spacer-Gruppen, an deren Ende sich freie Carboxylgruppen befinden. Über diese reaktionsfähigen Stellen können solche Liganden an die Agarosematrix gebunden werden, die selbst primäre Amino-Gruppen besitzen. Die Bindung des Liganden geschieht mit Hilfe einer einfachen Carbodiimid-Kopplungsreaktion unter Bildung von Harnstoff:



Wie schon im Vorhergehenden erwähnt, hat sich Benzamidin als guter Affinitätspartner von Akrosin bewährt. Zur Herstellung eines spezifischen Harzes zur Affinitätschromatographie von Akrosin koppelten wir p-Aminobenzamidin an die handelsübliche CH-Sepharose 4 B. Als Koppelungsreagenz verwandten wir das wasserlösliche 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoäthyl) carbodiimid-metho-p-toluen-sulfonat (CMC). Als Puffer diente 0,1 M 2-(morpholino) äthan-Sulfonsäure (MES) pH 4,75. Die Reaktionszeit beträgt 5 Stunden bei Raumtemperatur.

Nach Auswaschen der löslichen Reaktionsprodukte liegt dann das gebrauchsfertige Affinitätsharz vor. (Technische Details zur Harzherstellung im Kapitel "Material und Methoden").

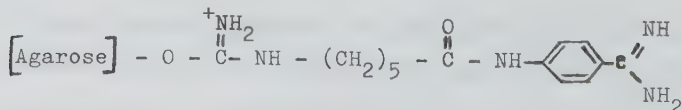


Abb. 5: p-Aminobenzamidin-6-Aminocapronyl-Agarose

Das gewaschene und in Pufferlösung suspendierte Gel wird in eine kleine, auf 4°C gekühlte Plastiksäule gefüllt und mit 0,1 M TRA/HCl-Puffer pH 7,8 unter Zusatz von 0,5 M NaCl äquilibriert. Die hohe Ionenstärke im Puffer soll unspezifische Bindungen von Protein an das Affinitätsharz verhindern.

Auf die so vorbereitete Affinitätschromatographie-Säule wird nun in einem kleinen Volumen (maximal 3 ml) eine durch Gel-filtration gewonnene, hochkonzentrierte und neutralisierte Akrosinlösung aufgetragen. Ist die Akrosinlösung in die Oberfläche des Harzes eingesickert, wird die Säule wieder mit TRA-Puffer aufgefüllt und über Nacht durchgewaschen. Das Eluat wird mit einem Fraktionensammler aufgefangen und über einen UV-Detektor mit gekoppeltem Schreiber bei 253 nm fortlaufend gemessen und registriert.

Das auf die Harzsäule aufgetragene Akrosin wird bei pH 7,8 und geeigneten Chromatographie-Verhältnissen (Durchflußgeschwindigkeit, Kühlung etc.) zu über 90 % an die ABA-Sepharose spezifisch gebunden. Der Rest an nichtgebundenem Akrosin sowie das noch enthaltene Fremdprotein erscheint im Durchlauf des Waschpuffers.

Wenn die Extinktion des Eluats wieder der Extinktion des Waschpuffers entspricht, also aus der Affinitätsharzsäule keine Substanzen mehr herausgewaschen werden können, dann kann mit der Ablösung des spezifisch gebundenen Akrosins begonnen werden.

Das im Neutralen an Benzamidin gebundene Akrosin wird im sauren Milieu bei ca. pH 3,0 wieder freigegeben und kann aus der Harzsäule eluiert werden. Die Elution erfolgt mit 0,1 M Glycinpuffer pH 2,5 in einem kleinen Puffervolumen (siehe Abbildung 6).

Die spezifische Aktivität des affinitätschromatographisch gereinigten Eberakrosins beträgt bis zu 15 U/mg (Substrat BAPA).

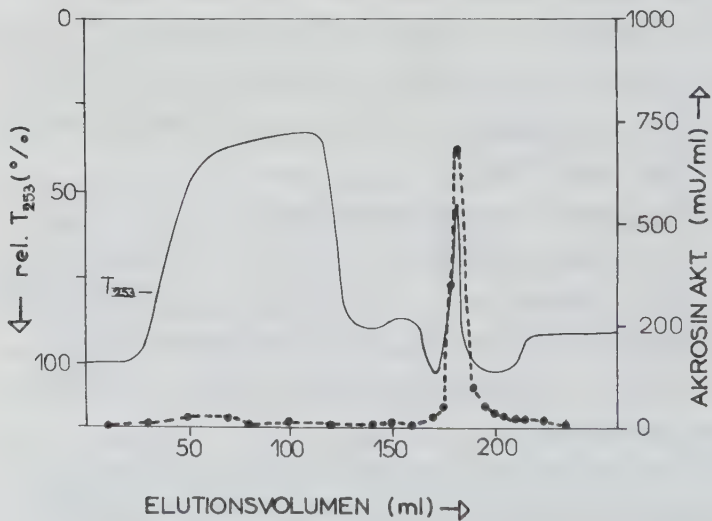


Abb. 6: Affinitätschromatographie mit ABA-Sepharose
Linke Ordinate: Rel. Transmission bei 253 nm
Rechte Ordinate: mU Akrosin/ml (Substrat BLNA)

Die Acrylamidgel-Elektrophorese der erhaltenen Akrosinpräparation zeigt nur eine scharf begrenzte Bande. Die elektrophoretische Einheitlichkeit kann als sicheres Zeichen für die Reinheit des Akrosins gelten (Abbildung 7).



Abb. 7: Polyacrylamidgel-Elektrophorese von affinitätschromatographisch gereinigtem Eberakrosin

5. Stabilisierung des Akrosins nach der Affinitätschromatographie

Akrosin erwies sich bislang als sehr labiles Enzym mit meist sehr raschen Aktivitätsverlusten. Offensichtlich treten Aktivitätsverluste beim Akrosin umso rascher ein, je reiner die vorliegende Präparation des Enzyms ist. Während noch inhibitorhaltige saure Spermienextrakte über Wochen und sogar Monate Akrosinaktivität aufweisen, nimmt die Aktivität gelchromatographisch gereinigter Akrosinpräparationen schon innerhalb weniger Tage um bis zu 40 % ab. Bei Zimmertemperatur ist der Aktivitätsverlust sogar noch rapider. (siehe Tabelle 2).

Am schnellsten erfolgt bei den affinitätschromatographisch gereinigten Akrosinpräparationen ein Verlust an proteolytischer Aktivität. Selbst bei Lagerungstemperaturen um 4°C ist schon nach 48 Stunden die Enzymaktivität auf die Hälfte zurückgegangen.

SCHLEUNING interpretiert dieses Phänomen damit, daß Fremdproteine die Funktion von "Schutzprotein" für Akrosin erfüllen. Je mehr Fremdprotein in einer Lösung vorhanden, um so besser werde Akrosin vor einer Denaturierung geschützt (38).

Eine Zerstörung von Akrosin droht auch bei Kontakt mit aktiven Oberflächen, wie z.B. Glas (27). Um zu vermeiden, daß Akrosin mit Glas in Verbindung kommt und inaktiviert wird, darf während des ganzen Isolations- und Untersuchungsvorgangs nur mit Plastik- oder silikonisierten Glasgeräten gearbeitet werden.

Um die hochgereinigten Akrosinpräparationen in eine stabile Form zu bringen, müssen sie entsalzt und dann lyophilisiert werden. Vor der Lyophilisierung muß jedoch eine stabilisierende Substanz zugesetzt werden, da anderenfalls Aktivitätsverluste bis zu 70 % auftreten.

Als Stabilisatorsubstanz hat sich reine Saccharose in einer Konzentration von 1 - 1,5 % bewährt (1). Die Saccharose wird während des Entsalzungsvorgangs dem Akrosin zugesetzt.

Zur Entsalzung des von der Affinitätschromatographiesäule eluierten Akrosins wird diese Fraktion ohne weitere Behandlung auf eine mit dem Kunstharz Merckogel P 2000 gefüllte und mit 0,1 M Ammoniumformiat- Puffer äquilibrierte Säule aufgebracht. In dem Formiat-Puffer sind zusätzlich 1,5 % Saccharose und 1 % Butanol (gegen Pilze und Bakterien) enthalten.

Die Akrosinfraktion kann so ohne Aktivitätsverluste salzfrei eluiert und sofort danach lyophilisiert werden. Bei der Lyophilisierung sind Verluste von ca. 5 % unvermeidbar.

Das stark hygroskopische Lyophilisat aus Saccharose und Akrosin kann bei 4 °C über Monate gelagert werden, ohne daß meßbare Aktivitätsverluste festgestellt werden.

3.6. Affinitätschromatographie von Eberakrosin an Con A-Sepharose

Con A-Sepharose ist ein im Handel erhältliches Material, bestehend aus einer unlöslichen Gelmatrix auf Agarose-Basis (Sepharose 4 B) an die Concanavalin A (Con A) kovalent gebunden ist.

Concanavalin A ist ein hämagglutinierendes Protein, das aus der Bohnensorte Canavalia ensiformis gewonnen wird. Neben seiner erythrozytenagglutinierenden Eigenschaft ist Con A in der Lage, mit vielen Polysacchariden (42, 43) und Glycoproteinen (44) unlösliche Komplexe zu bilden. Die Reaktion zwischen Con A und kohlehydrathaltigen Molekülen ist spezifisch für alpha-D-Glucosyl-, alpha-D-Mannosyl- und mit diesen sterisch eng verwandten Resten (43). Con A ist außerdem ein wirksames Stimulans für die Lymphozyten-Transformation (45).

Con A findet bei der affinitätschromatographischen Isolierung von Polysacchariden und Glycoproteinen Anwendung. Es liegt gebrauchsfertig als ein in einer Pufferlösung sedimentiertes Gel vor (0,1 M Natriumacetat pH 6,0 mit einem Überschuß an Calcium- und Magnesium-Ionen). Das Gel enthält eine Konzentration von ungefähr 8 mg gebundenem Concanavalin A pro ml Feuchtmasse.

Wir verwendeten Con A-Sepharose zur Affinitätschromatographie von Eberakrosin. Dabei gingen wir von der Annahme aus, daß das Akrosin ein Glycoprotein darstelle.

In einem typischen Experiment (siehe Abb. 8) trugen wir gelchromatographisch vorgereinigtes Akrosin in einer Gesamtmenge von 6 U (Substrat BAPA) auf eine mit Con A -Sepharose gepackte Säule auf. Das Akrosin war in 12 ml 1 M NaCl, 0,1 M Natriumacetat-Puffer pH 6,0 enthalten; die Säule wurde mit dem gleichen Puffer äquibriert und entwickelt. (Technische Details im Kapitel "Material und Methoden").

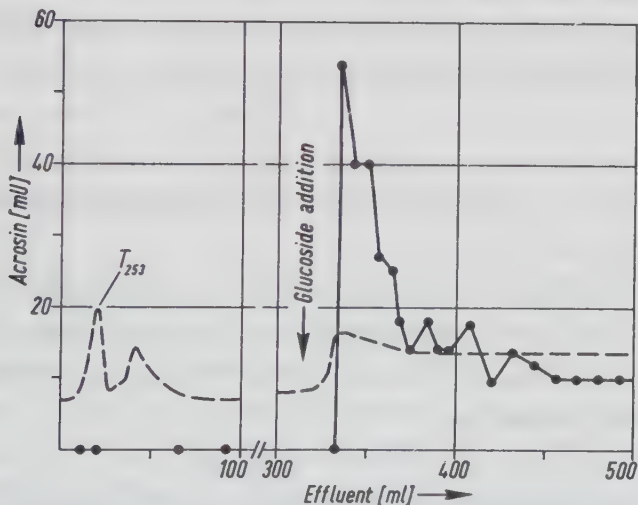


Abb. 8: Affinitätschromatographie von Eberakrosin mit Con A-Sepharose

Linke Ordinate: mU Akrosin/ml (Substrat BAPA)
 T 253: Rel. Transmission bei 253 nm
 ➔ Zusatz von 30 mg α -Methyl-D-Glucosid zum Puffer

Im Säulendurchlauf konnte keine Akrosinaktivität nachgewiesen werden, d.h. Akrosin wurde vollständig an Con A-Sepharose absorbiert.

Nach Zusatz von 30 mg alpha-Methyl-D-Glucosid pro ml Puffer erschien im Eluat Akrosinaktivität in mehreren Fraktionen. Die fraktionierte Elution kann als Zeichen dafür gewertet werden, daß die einzelnen Akrosinmoleküle Unterschiede in ihren Kohlehydratanteilen aufweisen.

Insgesamt konnten 65 % - 75 % der aufgetragenen Akrosinmenge im Eluat wieder gefunden werden. Bei diesem Schritt konnte eine 2-3-fache Reinigung des Akrosins erzielt werden.

Aus der strengen Interaktion zwischen Eberakrosin und Concanavalin A läßt sich die Glycoproteinnatur des Akrosins ableiten (42 - 44).

Es muß sich noch zeigen, ob über die Affinitätschromatographie mit Con A-Sepharose Akrosin an Hand von Unterschieden im Kohlehydratanteil in mehrere Unterformen zuverlässig aufgetrennt werden kann.

Als Reinigungsmethode für Akrosin erscheint die Affinitätschromatographie mit Con A-Sepharose weniger geeignet. Sowohl in der Ausbeute als auch in der Wirksamkeit ist die affinitätschromatographische Methode mit Hilfe von unlöslichen Benzamidin-Harzen, wie sie im vorhergehenden Kapitel beschrieben wurde, deutlich überlegen.

ISOLIERUNG VON AKROSIN UND AKROSININHIBITOR
AUS HAMSTERSPERMIEN

Nachdem wir, wie in den vorangehenden Kapiteln beschrieben, eine wirkungsvolle und relativ einfache Methode zur Feinreinigung und Stabilisierung von Eberakrosin entwickelt hatten, versuchten wir mit dieser Methode, auch Akrosin anderer Spezies zu isolieren und zu charakterisieren.

Da über Akrosin aus Hamsterspermien in der Literatur bislang noch keine Untersuchungsergebnisse vorlagen, erschien die Isolierung von Hamsterakrosin und seinen möglichen Inhibitoren besonders reizvoll.

1. Ausgangsmaterial für die Isolationsversuche

Als Ausgangsmaterial dienten epididymale, also nicht ejakulierte Spermien von ca. 50 geschlechtsreifen Hamstern, die operativ nach Tötung des Tieres gewonnen und ca. 30 Minuten danach in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Vor dem Einfrieren wurden die Spermien in einer Mischung aus Phosphatpuffer und physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und mit 10 % Glycerin versetzt. +)

+) Die Hamsterspermien stellte uns Dr. Ralph B. L. Gwatkin (Merck Institute for Therapeutic Research, Rahway, NJ, USA) freundlicherweise zur Verfügung.

Die eingefrorene Spermiesuspension wurde auf dem Luftweg tiefgekühlt nach Deutschland geschickt und erreichte das Institut in gutem Zustand. Hier wurde sie ca. 3 Wochen bis zum Beginn der Versuche in der Gefriertruhe aufbewahrt.

Die eingefrorene Hamstersuspension wurde über Nacht bei 4° C aufgetaut und anschließend 30 Minuten lang bei 1200 . g zentrifugiert. Der pH-Wert der Spermiesuspension lag bei 6,8. Der Überstand (25 ml) wurde vom Spermiesediment (ca. 3 ml) getrennt bei 4° C aufbewahrt.

4.2. Untersuchung der Suspensionsflüssigkeit auf Akrosingehalt

Ausgehend von den Erfahrungen im Umgang mit Eberspermien war zu vermuten, daß beim Einfrieren der suspendierten Hamsterspermien die Akrosomenkappe beschädigt wird und ein großer Teil des Akrosins und - sofern vorhanden - auch des Akrosininhibitors in das Suspensionsmedium übertritt.

Wir untersuchten daher den nach Zentrifugation der Spermiesuspension erhaltenen Überstand auf seinen Akrosingehalt. Als Testsystem für die Messung der Akrosinaktivitäten wurde das kombinierte BAEE/ADH-System verwandt, das sich zur quantitativen Erfassung selbst kleinster Enzymmengen bewährt hat (36).

Ein Teil des Überstandes wurde in sechs gleiche Portionen aufgeteilt. Eine Portion blieb unbehandelt (Probe 0), die fünf anderen wurden mit 2 N Salzsäure auf verschiedene

pH-Werte im Sauren eingestellt (Proben 1-5). Das Meßergebnis aller sechs Proben ist in der nachfolgenden Aufstellung zusammengefaßt:

	pH-Wert	Akrosinaktivität in mU/ml (Substrat BAEE)	
		nach 20 Minuten	nach 20 Stunden
Probe 0	6,8	keine	keine
Probe 1	4,5	keine	keine
Probe 2	3,5	30	42
Probe 3	2,9	127	134
Probe 4	2,5	145	142
Probe 5	2,0	185	keine

Aus den Testergebnissen der Suspensionsflüssigkeit epididymaler Hamsterspermien auf Akrosinaktivität lassen sich drei Folgerungen ableiten:

1. Hamsterakrosin, das aus epididymalen Spermien in das Suspensionsmedium entkommen ist, liegt im neutralen = physiologischen pH-Bereich als Akrosin-Akrosininhibitor-Komplex vor, der erst bei einem stark sauren pH dissoziiert und dann den Nachweis von Akrosin erlaubt.
2. Die Tatsache, daß in der Suspensionsflüssigkeit überhaupt Akrosin nachgewiesen werden konnte, bestätigt den von uns angenommenen schädigenden Effekt des Einfrierens auf die Akrosomenmembran der Spermien.

3. Offensichtlich ist Hamsterakrosin im Gegensatz zu Eberakrosin bei einem pH unter 2,5 nicht mehr stabil. Dies erklärt das völlige Verschwinden der Akrosinaktivität in Probe 5 (pH 2,0) bei der Messung 20 Stunden nach Versuchsbeginn. Die höhere Säurelabilität des Hamsterakrosins muß daher bei der weiteren Aufarbeitung berücksichtigt werden.

4.3. Extraktion des Akrosins aus Hamsterspermien

Das auf 4° C gekühlte Hamsterspermien-Sediment (ca. 3 ml Gesamtvolumen) wurde dreimal hintereinander jeweils 15 Minuten mit 2 %-iger Essigsäure pH 2,5 extrahiert (Einzelheiten im Abschnitt "Material und Methoden").

Die so gewonnenen 30 ml Hamsterspermien-Extrakt enthielten beim Test im BAEE/ADH-System eine Akrosinaktivität von insgesamt 7,8 U, entsprechend 260 mU/ml (Substrat BAEE).

Eine kleine Probe des Hamsterspermien-Extrakts (pH 2,5) wurde mit NaOH auf pH 8 umgestellt und nach 15 Minuten im BAEE/ADH-Test auf hydrolytische Aktivität gemessen: es konnte keine BAEE-spaltende Aktivität mehr nachgewiesen werden.

Demnach liegen in epididymalen Spermien - genau wie in ejakulierten - Akrosin und Akrosininhibitor gleichzeitig nebeneinander vor. In Spermienextrakten, die auf einen pH-Wert im Neutralen umgestellt wurden, läßt sich daher keine Akrosinaktivität nachweisen.

4. Trennung von Akrosin und Akrosininhibitor durch Gelfiltration

Der auf pH 2,5 angesäuerte Überstand und der aus dem Hamsterspermien-Sediment hergestellte essigsäure Extrakt wurden getrennt 20 Stunden bei 4° C gegen destilliertes Wasser dialysiert und anschließend unter Zusatz von 1 % Saccharose lyophilisiert.

Die beiden erhaltenen Lyophilisate wurden jeweils in 5 ml 2 %-iger Essigsäure pH 2,5 wieder aufgelöst und über Sephadex G-75 fraktioniert. Die Gelfiltrationssäule wurde ebenfalls mit 2 %-iger Essigsäure pH 2,5 unter Zusatz von 1 % Butanol entwickelt und äquibriert.

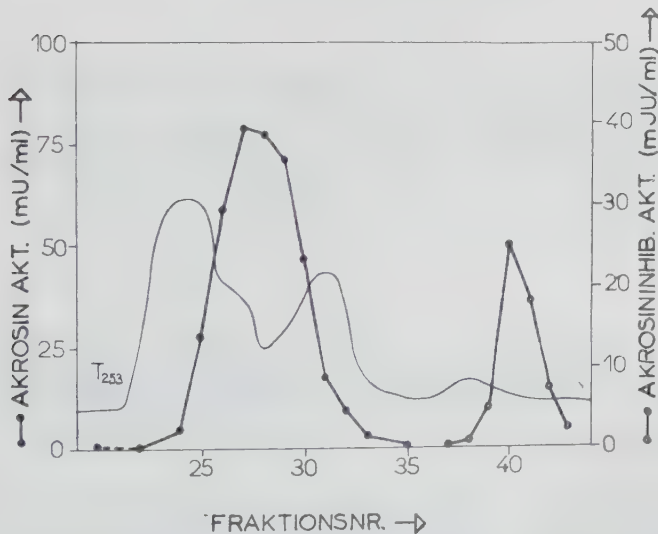


Abb. 9: Gelchromatographie von Hamsterspermien-Extrakt an Sephadex G-75
Linke Ordinate: mU Akrosin/ml (Substrat BAEE)
Rechte Ordinate: mIU Akrosininhibitor/ml (Substrat BAEE)
T 253: Rel. Transmission bei 253 nm

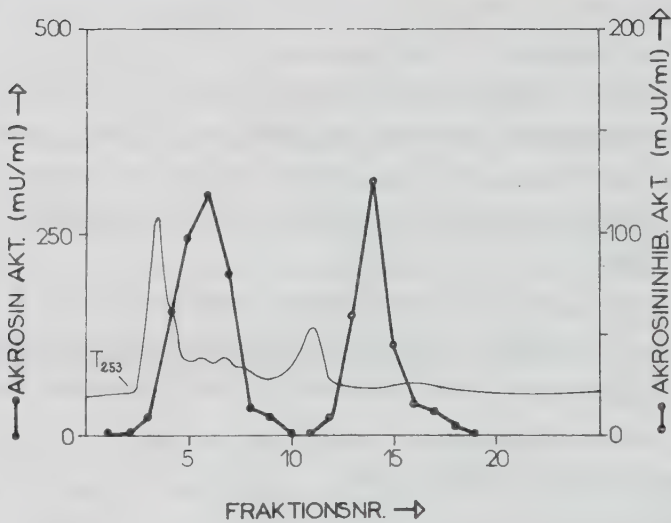


Abb. 10: Gelchromatographie von Hamsterspermien-Suspensionsflüssigkeit an Sephadex G-75
Linke Ordinate: mU Akrosin/ml (Substrat BAEE)
Rechte Ordinate: mIU Akrosininhibitor/ml (Substrat BAEE)
T 253: Rel. Transmission bei 253 nm

Die Abbildungen 9 und 10 zeigen das Ergebnis der Gelchromatographie über Sephadex G-75 (die genauen Versuchsbedingungen sind im Kapitel "Material und Methoden" beschrieben).

In beiden Gelfiltrationen konnte zuverlässig Inhibitor von Akrosin getrennt werden: auch nach Neutralisieren der akrosinhaltigen Eluat-Fraktion ergab die Messung im BAEE/ADH-Test nahezu die gleiche Akrosinaktivität wie in der sauren Lösung.

Die aus beiden Chromatographiesäulen eluierten Akrosinpeaks mit einer Gesamtaktivität von 38,5 U (Substrat BAEE) wurden zusammengefaßt und bis zur weiteren Aufarbeitung 2 Tage bei 4° C aufbewahrt.

Die aus der Fraktionierung der Suspensionsflüssigkeit erhaltene Inhibitorfraktion zeigte eine Hemmaktivität gegen Trypsin von insgesamt 80 mIU (Substrat BAEE) bei einer spezifischen Aktivität von 10 mIU/mg.

Der bei der Gelfiltration des Hamsterspermien-Extrakts isolierte Akrosininhibitor wies dagegen eine Hemmaktivität gegen Trypsin von insgesamt 1250 mIU (Substrat BAEE) bei einer spezifischen Aktivität von 418 mIU/mg auf. (Diese spezifische Aktivität entspricht einem Reinheitsgrad von ca. 40 %).

Die isolierten Akrosininhibitoren wurden von uns nicht weiter untersucht. Es muß daher zunächst offen bleiben, ob hier angesichts der erheblichen Unterschiede in der spezifischen Aktivität zwei verschiedene Inhibitoren vorliegen oder im Zuge der Materialaufarbeitung die eine Inhibitorfraktion teilweise inaktiviert wurde.

5. Affinitätschromatographie des Hamsterakrosins über ABA-Sepharose

Als Ausgangsmaterial für die Harzreinigung des Hamsterakrosins dienten uns die beiden durch Gelfiltration erhaltenen Akrosinfraktionen. Die essigsäuren Akrosinlösungen enthielten zusammen eine Gesamtaktivität von 38,5 U (Substrat BAEE) bei einem Volumen von 116 ml.

Die Lösung wurde auf eine Konzentration von 1 M Kochsalz gebracht und mit 0,05 M TRA/HCl und NaOH auf einen pH-Wert von 7,6 eingestellt. Der beim Neutralisierungsvorgang aufgetretene Niederschlag wurde durch Ultrazentrifugation bei 15 000.g abgetrennt.

Die Testung der neutralisierten und zentrifugierten Akrosinlösung ergab nur noch eine Gesamtaktivität von 29,5 U (Substrat BAEE). Demnach war bei diesem Schritt ein Verlust von ca. 20 % zu verzeichnen.

Zur Affinitätschromatographie gebrauchten wir - wie bei der Reinigung des Eberakrosins - trägergebundenes Benzamidin (ABA-Sepharose). Auch Technik und Methode des Vorgehens entsprachen völlig der affinitätschromatographischen Behandlung des Eberakrosins (siehe Abschnitt 3.4.3.)

Die Hamsterakrosin enthaltende neutrale Lösung wurde bei konstanter Temperatur (4° C) mit Hilfe einer Schlauchpumpe auf die Harzsäule aufgetragen. Die Säule wurde anschließend 5 Stunden mit TRA-Puffer pH 7,8 durchgewaschen. Im Eluat des Waschpuffers konnte keine Akrosinaktivität nachgewiesen werden; demnach wurde also das Hamsterakrosin vollständig an das Benzamidin-Harz gebunden, während Fremdprotein die Säule ungehindert passierte. Zur Ablösung vom Harz wurde dann der Puffer resp. das pH-Milieu gewechselt (0,1 M Glycin-Puffer pH 2,5) und das gereinigte Hamsterakrosin in einem kleinen Puffer-volumen eluiert.

Die Testung der harzgereinigten Akrosinfraktion im BAEE/ADH-System ergab eine Gesamtaktivität von 2,4 U (Substrat BAEE). Bei einer Ausgangsaktivität von 29,5 U entspricht das einer Ausbeute von knapp 10 %. Diese überraschend niedrige Ausbeute steht in krassem Widerspruch zu unseren Ergebnissen bei der Affinitätschromatographie von Eberakrosin (Ausbeute dort: 90 % !), zumal unter nahezu identischen Versuchsbedingungen gearbeitet wurde.

Eine voll befriedigende Erklärung für diesen unterschiedlichen Wirkungsgrad der Affinitätschromatographie können wir zur Zeit nicht geben. Möglicherweise spielen hier die unterschiedlichen Ausgangsmengen von Hamster- bzw. Eberakrosin eine Rolle. Es wurde nämlich immer wieder beobachtet, daß affinitätschromatographische Trennverfahren erst ab einer bestimmten Konzentration an Ausgangsmaterial brauchbare Ergebnisse lieferten (46). Auf Grund der Schwierigkeiten, größere Mengen an Hamsterspermin zu beschaffen, konnten wir dieses Problem bisher nicht weiter untersuchen.

Das von der Harzsäule eluierte Hamsterakrosin wurde, wie unter Abschnitt 3.5. beschrieben, entsalzt, mit Saccharose versetzt und durch Lyophilisieren in eine stabile Form gebracht.

FINK untersuchte das affinitätschromatographisch gereinigte Hamsterakrosin auf seinen Reinheitsgrad. Er fand im BAEE/ADH-System eine Aktivität von 500 mU/ml. Durch Aminosäureanalyse

wurde eine Proteinkonzentration von 65 Mikrogramm/ml ermittelt. Aus diesen Werten ergibt sich für das Harzgereinigte Hamsterakrosin die hohe spezifische Aktivität von 7,7 U/ml (Substrat BAEE) (47).

MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Materialien zur Enzymtestung:

N^α - Benzoyl-L-Arginin-Äthylester-HCl (BAEE) Art. 1672

N^α - Benzoyl-DL-Arginin-p-Nitroanilid-HCl (BAPA) Art. 1670

N^α - Benzoyl-DL-Lysin-p-Nitroanilid-HCl (BLNA) Art. 10269

von Firma E. Merck, Darmstadt.

Alkohol-Dehydrogenase Kristallsuspension von Fa.Boehringer Mannheim.

Trypsin kristallin "reinst" von Fa. Novo.

1.2. Materialien zur Gelchromatographie:

Sephadex G-75 von Fa. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala.

Merckogel P 2000 von Fa. E. Merck, Darmstadt.

1.3. Materialien zur Affinitätschromatographie:

CH-Sepharose 4 B und Con-A-Sepharose von Fa. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala.

1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoäthyl) carbodiimid metho-p-toluen-sulfonat (CMC) von Fa. EGA-Chemie, Steinheim.

p-Aminobenzamidin-HCl von Fa. Sigma-Chemie.

α-Methyl-D-Glucosid von Fa. E. Merck, Darmstadt.

5.1.4. Materialien für die Polyacrylamid-Elektrophorese:

Acrylamid, Methylen-bis-acrylamid und N, N, N', N'-Tetramethylenäthylendiamin (TEMED) von Fa. E. Merck, Darmstadt. Coomassie Brilliant Blue R-250 von Fa. Serva, Heidelberg.

Alle anderen Reagenzien waren vom höchsten im Handel erhältlichen Reinheitsgrad.

5.2. Methoden

5.2.1. Akrosin aus Eberspermien

5.2.1.1. Herstellung der Spermienextrakte:

Ebersperma wurde bei 4° C und 600.g zentrifugiert. Das Spermien-sediment wurde dreimal hintereinander in jeweils 50 ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und anschließend zentrifugiert. Nach diesem Waschvorgang wurden die Spermien in 0,067 M Phosphat-Puffer pH 7,8 suspendiert, mit 10 % Glycerin versetzt und nach 30 Minuten in flüssigem Stickstoff bei - 196° C eingefroren.

Nach Wiederauftauen wurde die Spermien-suspension mit dem doppelten Volumen 2 %-iger Essigsäure pH 2,3 versetzt und unter vorsichtigem Umrühren 20 Minuten so belassen.

Anschließend erfolgte für 10 Minuten eine Zentrifugation bei 1200.g. Der dabei entstandene weißlich trübe Überstand wurde abdekantiert und bei 4° C aufbewahrt. Die Extraktion mit Essigsäure und die anschließende Zentrifugation wurden insgesamt 5 mal wiederholt.

Die gesammelten sauren Extrakte wurden ultrazentrifugiert (15000•g für 100 Minuten) und danach durch Ultrafiltration (Amicon-System, Membran UM 20) innerhalb von 4 bis 8 Stunden auf ein Zehntel ihres ursprünglichen Volumens eingeengt.

5.2.1.2. Gelchromatographie mit Sephadex G-75:

Säulenmaße: 130 x 5 cm.

Elutionsmittel: 2 %-ige Essigsäure pH 2,3.

Säule und Puffer wurden auf 4° C gekühlt.

Elutionsgeschwindigkeit: 30 ml/Stunde.

Fraktionsvolumen: 7,5 ml.

5.2.1.3. Die spezifische Aktivität des Akrosins betrug nach der Gel-filtration zwischen 0,7 und 1,8 U/mg Protein, wenn BAPA als Substrat verwendet wurde.

Die Proteinmenge wurde durch Vergleich der Absorbtion akrosin-haltiger Lösungen mit der einer 1 %-igen Gammaglobulin-Lösung bei 280 nm photometrisch bestimmt. Dabei bezogen wir uns auf den von FINK et al. angegebenen Wert: E_{280} einer 1 %-igen Gammaglobulin-Lösung = 11,8 (1 cm-Küvette) (36).

5.2.1.4. Herstellung des Affinitätsharzes:

15 g der pulverförmigen CH-Sepharose 4 B wurden in einem Überschuß von 0,5 M Kochsalzlösung zum Quellen gebracht. Das gequollene Gel (ca. 60 g) wurde dann nach Firmenvorschrift ausgiebig mit 0,5 M Kochsalzlösung, und dann mit destilliertem

Wasser durchgewaschen. Anschließend wurde das Gel in 0,1 M MES-Puffer pH 4,75 suspendiert, so daß sich ein Verhältnis Puffer zu Gel von 2:1 einstellte. Dieser Gelsuspension setzten wir unter vorsichtigem Rühren ein Gramm p-Aminobenzamidin zu. Nach 30 Minuten gaben wir dann 50 ml 0,1 M MES-Puffer pH 4,75, in dem 100 mg / ml Carbodiimid (CMC) gelöst waren, hinzu. Unter ständigem Rühren ließen wir das Gemisch 5 Stunden bei Zimmertemperatur reagieren, wobei auf eine genaue Einhaltung des pH-Wertes (pH 4,75) geachtet werden mußte.

Nach erfolgter Koppelungsreaktion wurde das Harz dann über einer Glasfritte mittels Saugdruck ausgiebig mit sauren und alkalischen Pufferlösungen von hoher Ionenstärke (1 M NaCl) durchgewaschen, um lösliche Reaktionsprodukte zu entfernen.

Abschließend wurde das Harz mit 0,1 M TRA/HCl-Puffer pH 7,8 unter Zusatz von 0,5 M NaCl äquilibriert.

Wir hatten nun das gebrauchsfertige ABA-Sepharoseharz vorliegen.

5.2.1.5. Affinitätschromatographie mit ABA-Sepharose:

Die durch Gelfiltration gewonnene essigsäure Akrosinlösung wurde durch Ultrafiltration (Amicon-System, Membran UM 20) auf ein Viertel des ursprünglichen Volumens eingeeengt und mit 1 M TRA-HCl-Puffer und 2 N NaOH auf einen pH-Wert von 7,8 gebracht. Durch Zugabe von kristallinem Kochsalz war zuvor eine Konzentration von 0,5 M NaCl in der Lösung hergestellt worden.

Beim Neutralisierungsvorgang ausgefallene Proteine, die eine leichte Trübung der Lösung bewirkten, konnten durch Ultra-

zentrifugation (25000·g für 30 Minuten) leicht abgetrennt werden.

Die neutralisierte, hochkonzentrierte Akrosinlösung wurde auf die Affinitätsharzsäule (20 x 2 cm) aufgetragen. Nach dem Auftrag wurde die Säule über mehrere Stunden mit 0,1 M TRA-HCl-Puffer pH 7,8 durchgewaschen, bis die Extinktion im Eluat wieder der Extinktion des Puffers entsprach.

Die Elution des harzgebundenen Akrosins erfolgte mit 0,5 M NaCl, 0,1 M Glycinpuffer pH 2,5 in einem kleinen Puffervolumen.

Elutionsgeschwindigkeit: 12,5 ml/Stunde

Fraktionsvolumen: 5,5 ml

5.2.1.6. Stabilisierung des harzgereinigten Akrosins:

Die affinitätschromatographisch gereinigte Akrosinfraktion wurde sofort auf eine gekühlte (4° C) Merckogel-P 2000-Säule aufgebracht und ohne Verluste unter Zusatz von Saccharose als Stabilisierungsmittel entsalzt. Die Säule war mit 0,1 M Ammoniumformiat-Puffer pH 3,0 unter Zusatz von 1,5 % Saccharose und 1 % Butanol entwickelt und äquilibriert.

Säulenmaße: 135 x 2 cm

Elutionsgeschwindigkeit: 15 ml/Stunde

Fraktionsvolumen: 7,5 ml

Die entsalzte saccharosehaltige Akrosinlösung wurde anschließend in silikonisierten Glaskolben lyophilisiert und dadurch in eine stabile Form gebracht.

5.2.1.7. Affinitätschromatographie mit Con A-Sepharose:

40 ml gebrauchsfertige ConA-Sepharose-Emulsion wurden in 0,1 M Natriumacetat-Puffer pH 6,0 unter Zusatz von 1 M NaCl und 0,02 % Natriumacid äquilibriert und in eine auf 4° C gekühlte Plastik-säule (20 x 2 cm) gepackt.

Durch Gelfiltration vorgereinigte Akrosinlösung wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt und mit 0,1 M NaCl ver-
setzt.

Diese Akrosinlösung mit einer Gesamtaktivität von 6 U (Substrat BAPA) wurde auf die Harzsäule aufgetragen. Wir wuschen die Säule mit dem Acetatpuffer so lange durch, bis keine Trans-
missionsänderungen mehr registriert werden konnten. Dann
setzten wir dem Puffer 30 mg/ml α - Methyl-D-Glucosid zu und
konnten so das an Con A-Sepharose gebundene Akrosin eluieren.
Elutionsgeschwindigkeit: 14 ml/Stunde
Fraktionsvolumen: 6,5 ml

5.2.2. Akrosin aus Hamsterspermien

5.2.2.1. Herstellung der Spermienextrakte:

Das mit wenig physiologischer Kochsalzlösung suspendierte Hamsterspermien-sediment (ca. 3 ml) wurde bei 4° C drei mal
hintereinander jeweils 15 Minuten mit 2 %-iger Essigsäure
pH 2,5 extrahiert, im Volumenverhältnis: 2 Teile Essigsäure
auf 1 Teil Spermien-sediment.

Die so erhaltenen 30 ml Hamsterspermienextrakt wurden ultra-
zentrifugiert (18000•g für 90 Minuten) und anschließend

20 Stunden bei 4° C gegen destilliertes Wasser dialysiert.
Daruf folgte eine Lyophilisierung in silikonisierten Glaskolben unter Zusatz von 1 % Saccharose.

5.2.2.2. Gelfiltration mit Sephadex G-75:

Der lyophilisierte Hamsterspermienextrakt und die ebenfalls lyophilisierte akrosinhaltige Suspensionsflüssigkeit wurden jeweils in 5 ml 2 %-iger Essigsäure pH 2,5 wieder aufgelöst und einzeln über Sephadex G-75 fraktioniert.

Beide Säulen waren mit 2 %-iger Essigsäure pH 2,5 unter Zusatz von 0,5 M NaCl und 1 % Butanol entwickelt und äquilibriert.

Gelfiltration des Hamsterspermienextrakts:

Säulenmaße: 2 x 150 cm

Elutionsgeschwindigkeit: 13 ml/Stunde

Fraktionsvolumen: 5,3 ml

Gelfiltration der Hamsterspermien-Suspensionsflüssigkeit:

Säulenmaße: 2 x 21 cm

Elutionsgeschwindigkeit: 12 ml/Stunde

Fraktionsvolumen: 4 ml

5.2.2.3. Affinitätschromatographie mit ABA-Sepharose:

Das verwendete Affinitätsharz wie auch die Versuchsanordnung entsprachen in jeder Beziehung den beim Eberakrosin beschriebenen Bedingungen.

5.2.3. Verwendete Enzymtest-Systeme

5.2.3.1. BAPA-System:

Wir maßen die BAPA-spaltende Aktivität des Akrosins nach der von FRITZ, TRAUSCHOLD und WERLE angegebenen Vorschrift (48). Das Volumen in der Meßküvette betrug 3 ml und setzte sich folgendermaßen zusammen:

$(2 - x)$ ml TRA/HCl pH 7,8 + 1,0 ml BAPA-Lösung + x ml Akrosinlösung

Die Extinktionsdifferenzen pro Minute wurden bei 405 nm in einer Gesamtmeßzeit von 10 Minuten registriert. Meßtemperatur: 25° C.

5.2.3.2. BLNA-System:

Die Testbedingungen entsprachen völlig dem BAPA-Test. Nur wurde anstelle von BAPA als Substrat BLNA in einer Konzentration von 2,4 mg/ml verwendet.

Auf Grund der geringeren Umsatzrate des BLNA entspricht 1 mU im BLNA-System 14 mU im BAPA-System.

5.2.3.3. BAEE/ADH-System:

Wir verwendeten die von FINK et al. (36) angegebene Methode, bei der die Hydrolyse von BAEE indirekt über eine Zunahme der NADH-Konzentration gemessen wird.

1 mU im BAEE/ADH-System entspricht 0,09 mU im BAPA-System.

Akrosin spaltet demnach in der gleichen Zeit 11 mal mehr BAEE als BAPA.

5.2.4. Polyacrylamidgel-Diskelektrophorese:

Wir untersuchten das affinitätsharzgereinigte Eberakrosin auf sein elektrophoretisches Verhalten.

Die Untersuchungen wurden in einer Shandon Diskelektrophorese-Apparatur unter Verwendung von 7,5 x 4,5 Pyrex-Glasröhrchen durchgeführt. Als Spannungsgerät diente der Typ 3371 der Fa. LKB.

Das Gel bereiteten wir nach der von WEBER, PRINGLE und OSBORN angegebenen Vorschrift zu (49).

Die Laufzeit betrug 100 Minuten bei einer Stromstärke von 5,5 mA pro Röhrchen. Die Elektrophoreseapparatur wurde während der gesamten Versuchsdauer auf 4° C gekühlt.

Zur Proteinfärbung verwandten wir Coomassie-Brilliant Blue nach der in (49) beschriebenen Methode.

In der Polyacrylamidgel-Elektrophorese des harzgereinigten Eberakrosins zeigte sich nur eine scharfe Proteinbande.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschreibt ein Verfahren zur Isolierung der basischen Proteinase AKROSIN aus Eber- und Hamsterspermien. In wenigen aufeinander folgenden Isolationschritten kann aus den Spermien eine hochreine und stabile Akrosinpräparation hergestellt werden.

Der Isolationsvorgang umfaßt im Einzelnen:

- Die Extraktion des Akrosins aus den Spermien mit 2 %-iger Essigsäure.
- Die Gelfiltration der Spermienextrakte über Sephadex G-75 zur Abtrennung der Akrosininhibitoren.
- Die Feinreinigung der inhibitorfreien Akrosinlösung durch Affinitätschromatographie an harzgebundenem Benzamidin (ABA-Sephrose).
- Die Stabilisierung des affinitätschromatographisch gereinigten Akrosins durch Entsalzung und nachfolgende Lyophilisation unter Zusatz von Saccharose als Stabilisierungsmittel.

Diese Methode ist zur Isolation größerer Akrosinmengen geeignet. Sie scheint auf Akrosin verschiedener Spezies gleichermaßen anwendbar zu sein.

Die Affinitätschromatographie von Eberakrosin an Con A-Sephrose zeigt auf, daß Akrosin ein Glycoprotein darstellt.

Die Versuche mit Con A-Sephrose lassen zudem vermuten, daß

Akrosin in mehreren Erscheinungsformen vorkommt, die sich in ihrem Kohlehydratanteil voneinander unterscheiden.

Zur Feinreinigung des Akrosins ist die Affinitätschromatographie mit Con A-Sepharose weniger geeignet, da Ausbeute und Reinigungsfaktor bei Verwendung von Benzamidinharzen wesentlich höher liegen.

Nach der Affinitätschromatographie an ABA-Sepharose zeigt Akrosin in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese nur eine scharfe Proteinbande. Das elektrophoretisch einheitliche Verhalten beweist den hohen Reinheitsgrad der Akrosinpräparation, die eine spezifische Aktivität bis 15 U/mg Protein aufweist (Substrat BAPA).

Die Versuche mit epididymalen Hamsterspermien weisen eindeutig nach, daß - entgegen früheren Vermutungen - auch epididymale Spermien einen Akrosininhibitor enthalten. Dieser Inhibitor kann durch Gelfiltration der sauren Spermienextrakte isoliert werden.

7.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Schleuning, W.D., H. Schießler, H. Fritz, Z. Physiol. Chem. 354, 550 (1973)
- (2) Bedford, J.M., in: H. Gibian, E.J. Plotz: Mammalian Reproduktion. 21. Colloquium der Gesellschaft für Biologische Chemie, Mosbach 1970, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1970, S. 124 - 182
- (3) Austin, C.R., in: G. Raspé: Advances in Biosciences 4. Schering Symposium on Mechanisms Involved in Conception, Berlin 1969. Pergamon Press Vieweg Verlag, Braunschweig 1970, S. 5-11
- (4) Chang, M.C. ebenda, S. 13-24
- (5) Bedford, J.M. ebenda, S. 35-50
- (6) Brackett, B.G. ebenda, S. 73-94
- (7) Williams, W.L., R.T. Robertson, W.R. Dukelow, ebenda, S. 61-72
- (8) Chang, M.C., Nature (Lond.) 179, 258 (1957)
- (9) Zaneveld, L.J.D., R.A. McRoris, W.L. Williams, Fed. Proc. Amer. Soc. exp. Biol. 28, 705 (1969)

- (10) Stambaugh R., J. Buckley, Science 161, 585 (1968)
- (11) Stambaugh R., J. Buckley. Fert. Steril. 23, 348 (1970)
- (12) Hartree, E.F., in: Of Microbes and Life, p. 271, Eds.
J. Monod and E. Borek. Columbia University Press,
New York 1971
- (13) Brown, C.R., E.F. Hartree, J. Reprod. Fert 36, 195 (1974)
- (14) Schill, W.-B., H.H. Wolff, Naturwissenschaften 61, 172
(1974)
- (15) Allen, G.J., M.W.H. Bishop and T.E. Thompson, J. Reprod.
Fert. 36, 249 (1974)
- (16) Allison, A.C. and E.F. Hartree, J. Reprod. Fert. 21, 501
(1970)
- (17) Buruiana, L.M., Naturwissenschaften 43, 523 (1956)
- (18) Waldschmidt, M., B. Hoffmann, H. Karg, Zuchthygiene 1, 15
(1966)
- (19) Benitez-Bribriesca, L. and S. Velazquez-Meza, J. Reprod.
Fert. 29, 419 (1972)
- (20) Bernstein, M.H. and R.J. Teichmann, J. Reprod. Fert.
33, 239 (1973)

- (21) Brown, C.R., E.F. Hartree, J. Reprod. Fert. 36, 195,
(1974)
- (22) Buruiana, L.M., Naturwissenschaften 43, 523, (1956)
- (23) Churg, A., L.J.D. Zaneveld, G.F.B. Schumacher, Biol.
Reprod. 10, 429 (1974)
- (24) Connors, E.C., F.C. Greenslade, J.P. Davanzo, Biol.
Reprod. 9, 57 (1973)
- (25) Haendle, H., H.Fritz, I. Trautschold, E. Werls, Z. phy-
siol. Chem. 343, 185 (1965)
- (26) Fritz, H., I. Trautschold, H. Haendle, E. Werle, Ann.
N.Y. Acad. Sci. 146, 400 (1968)
- (27) Schiebler, H., H. Fritz, M. Arnhold, E. Fink u.
H. Tschesche, Z. Physiol. Chem. 353, 1 638 (1972)
- (28) Zaneveld, L.J.D., K.L. Polakoski, C. W. Foley,
W.L. Williams, Fed. Proc. 30, Abstr. 2241 (1971)
- (29) Wendt, V., W. Leidl, H. Fritz, Z. Physiol. Chem. 356,
315 - 323 (1975)
- (30) Polakoski, K.L., Zaneveld, L.J.D., W.L. Williams,
Biol. Reprod. 6, 23 (1972)

- (31) Hartree, E.F., P.N. Srivastava, J. Reprod. Fert. 9, 47 (1965)
- (32) Zaneveld, L.J.D., K.L. Polakoski, W.L. Williams, Acrosomes. Biol. Reprod. 9, 219 (1973)
- (33) Zaneveld, L.J.D., P.N. Srivastava, W.L. Williams, J. Reprod. Fert. 20, 337 (1969)
- (34) Pedersen, H., J. Reprod. Fert. 31, 99 (1972)
- (35) Morton, B.W., J. Reprod. Fert. 15, 113 (1968)
- (36) Fink, E., H. Schießler, M. Arnhold, H. Fritz, Z. Physiol. Chem. 353, 1 633 (1972)
- (37) Schill, W.B., Persönl. Mitteilung
- (38) Schleuning, W.D., Dissertation, München 1974
- (39) Schleuning, W.-D., H. Fritz, Z. Physiol. Chem., 355, 125 (1974)
- (40) Cuatrecasas, P., M. Wilchek, C.B. Anfinsen, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 61, 636 (1968)
- (41) Cuatrecasas, P., J. Biol. Chem. 245, 3059 (1970)

- (42) Goldstein, I.J., Hollermann, C.E. u. Merrick, J.M.,
Biochim. Biophys. Acta 97, 68 - 76 (1965)
- (43) Clarke, A. E. u. Demborough, M.A., Biochem. J. 121,
811 - 916 (1971)
- (44) Allan, D., Auger, J. u. Crumpton, M.J., Nature New Biol.,
236, 23 - 25 (1972)
- (45) Douglas, S.D., Kamin, R.M., Fudenberg, H.H.,
J. Immunol. 103, 1185 - 1195 (1969)
- (46) Fritz, H., persönliche Mitteilung
- (47) Fink, E., unveröffentlichte Ergebnisse
- (48) Fritz, H., J. Trautschold, E. Werle, in:
Methoden der Enzym. Analyse (Hrsg.: H.U. Bergmeyer),
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, S. 1021-1038 (1970)
- (49) Weber, K., J.R. Pringle, M. Osborn in:
Methods in Enzymology (Colowick, S.P. & N.O. Kaplan, eds.)
Vol. XXVI, Academic Press, New York & London, S. 3 - 27
(1970)
- (50) Fritz, H., E. Fink, R. Marx in: Marx, R., H.A. Thies:
Sexualhormone und Blutgerinnung. XIV. Hamburger Sym-
posium über Blutgerinnung, 21. und 22. Mai 1971,
F.K. Schattauer-Verlag, S. 33-49 (1971)

LEBENS LAUF

Geboren: 14.2.1949 in Heidelberg

Vater: Prof. Dr. med. Hans Nothdurft,
Laborleiter

Mutter: Lore Nothdurft, geb. Gunzert,
Sekretärin

1955 - 1959 Volksschule in Heidelberg

1959 - 1967 Humanistisches Gymnasium in Heidelberg;
Abitur im Juni 1967

WS 1967/68 Beginn des Medizinstudiums an der
Universität Heidelberg

SS 1969 Wechsel an die Universität München

WS 1969/70 Physikum

SS 1973 Medizinisches Staatsexamen an der
Universität München

27.7.1973 Eheschließung mit Christiane Nothdurft,
geb. Liebl

1.9.1973 - 30.4.1974 Medizinalassistent am Institut für
Klin. Chemie und Klin. Biochemie
der Universität München; Arbeiten an
vorliegender Dissertation

1.5.1974 - 30.8.1974 Medizinalassistent an der I. Med. Klinik
der Universität München

1.10.1974 - 28.2.1975 Medizinalassistent an der Chirurgischen
Poliklinik der Universität München

31.1.1975 Approbation als Arzt

seit 1.7.1975 Assistenzarzt am Pathologischen Institut
des Städt. Krankenhauses München-
Schwabing

